

30. 3. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

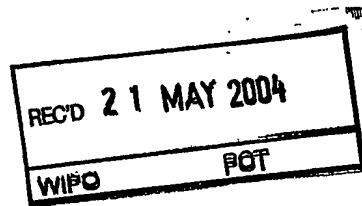
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月31日
Date of Application:

出願番号 特願2003-093834
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP2003-093834]

出願人 財団法人神奈川科学技術アカデミー
Applicant(s): 山内 哲也

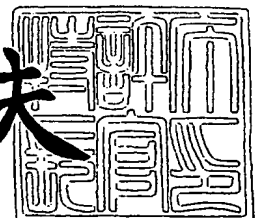


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 03835
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/543
【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 - 3 - 1 - 7 0 7

【氏名】 伊藤 嘉浩

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市戸塚区汲沢 7 - 2 0 - 5

【氏名】 蓮田 寛和

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区桜上水 2 - 1 5 - 5

【氏名】 金野 智浩

【発明者】

【住所又は居所】 東京都三鷹市井口 5 - 8 - 1 7

【氏名】 石原 一彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区千鳥 2 - 2 8 - 2 レゾン千鳥町 2 0 1

【氏名】 山内 哲也

【特許出願人】

【持分】 095/100

【識別番号】 591243103

【氏名又は名称】 財団法人神奈川科学技術アカデミー

【特許出願人】

【持分】 005/100

【住所又は居所】 東京都大田区千鳥 2 - 2 8 - 2 レゾン千鳥町 2 0 1

【氏名又は名称】 山内 哲也

【代理人】

【識別番号】 100088546

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

【電話番号】 03-3238-9182

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053235

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

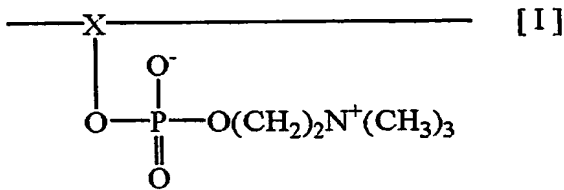
【書類名】 明細書

【発明の名称】 物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体

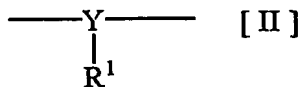
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基体上に所望の物質を固定化するために用いられる水溶性のポリマーであって、下記一般式[I]で表される構造を有する単位と、下記一般式[II]で示される構造を有する単位を含む、物質固定化剤。

【化 1】



【化 2】



(ただし、一般式[I]及び[II]中、X及びYは、互いに独立して、重合した状態の重合性原子団を表し、 R^1 は光反応性基を有する原子団を表し、一般式[I]及び[II]で表される単位は、それぞれ2個以上であり、かつ、一般式[I]で表される単位の数、一般式[II]で表される単位の数よりも大きい)。

【請求項 2】 前記光反応性基がアジド基である請求項 1 記載の物質固定化剤。

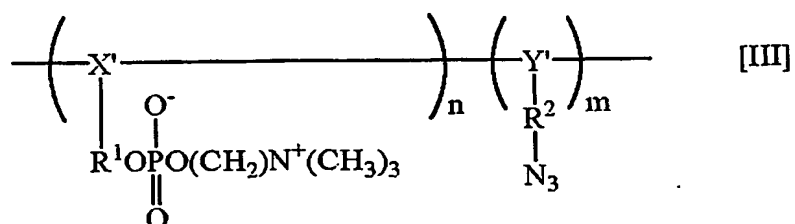
【請求項 3】 一般式[I]で表される単位の数と一般式[II]で表される単位の数との比が 100 : 2 ~ 100 : 50 である請求項 1 又は 2 記載の物質固定化剤。

【請求項 4】 前記ポリマーの分子量が、1,000~1,000,000である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の物質固定化剤。

【請求項 5】 X及びYがビニル系モノマー由来である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の物質固定化剤。

【請求項 6】 前記物質固定化剤が、下記一般式[III]で表される請求項 2 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の物質固定化剤。

【化 3】



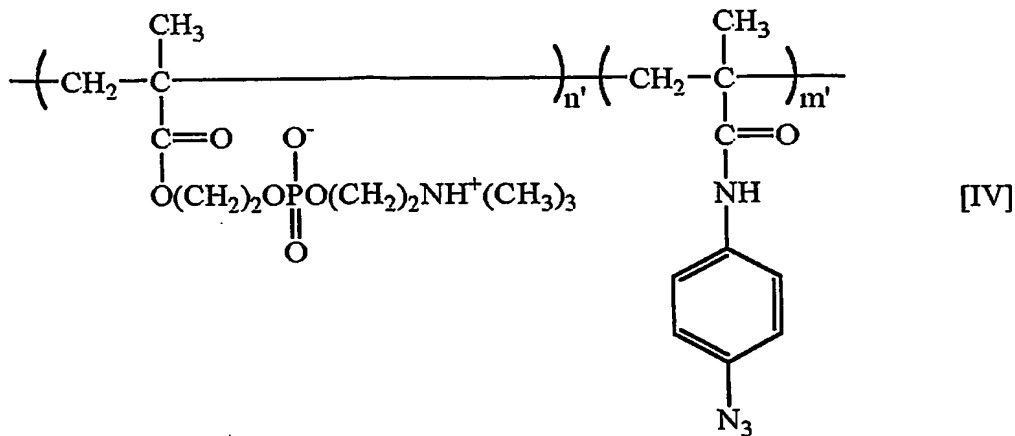
(ただし、式中、X' 及び Y' は、互いに独立して、ビニル部分が付加重合している状態のメタクリルオキシ基、メタクリルアミド基、アクリルオキシ基、アクリルアミド基、スチリルオキシ基又はスチリルアミド基を表し、R¹ は単結合又は炭素数 1～10 のアルキレン基 (ただし 1 個又は 2 個のヒドロキシル基で置換されていてもよい) を表し、R² は単結合、炭素数 1～10 のアルキレン基 (ただし 1 個又は 2 個のヒドロキシル基で置換されていてもよい)、フェニレン基 (ただし、1～3 個の炭素数 1～4 のアルキル基又はヒドロキシル基で置換されていてもよい)、n 及び m は、互いに独立して 2 以上の整数であり、かつ、n は m よりも大きく、X' を含む単位と Y' を含む単位はランダムな順序で結合している) を表す請求項 5 記載の物質固定化剤。

【請求項 7】 X' を含む単位が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、N-(2-メタクリルアミド)エチルホスホリルコリン、4-メタクリロイルオキシブチルホスホリルコリン、6-メタクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-メタクリロイルオキシデシルシルホスホリルコリン、 ω -メタクリロイルジオキシエチレンホスホリルコリン又は 4-スチリルオキシブチルホスホリルコリンに由来する請求項 6 記載の物質固定化剤。

【請求項 8】 前記一般式 [I] で示される単位が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する請求項 7 記載の物質固定化剤。

【請求項 9】 下記式 [IV] で表される請求項 8 記載の物質固定化剤。

【化 4】



(ただし、 n' は50ないし200の整数、 m' は5ないし40の整数を表し、ホスホリルコリン含有単位と、アジドフェニル基含有単位はランダムな順序で結合している)。

【請求項10】 基体に固定化する物質が、ポリペプチド、核酸、脂質並びに細胞及びその構成要素から成る群から選ばれる請求項1ないし9のいずれか1項に記載の物質固定化剤。

【請求項11】 基体に固定化すべき物質と、請求項1ないし9のいずれか1項に記載の物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を前記基体に塗布し、光照射することを含む、基体上への物質の固定化方法。

【請求項12】 基体に固定化する物質が、ポリペプチド、核酸、脂質並びに細胞及びその構成要素から成る群から選ばれる請求項11記載の方法。

【請求項13】 前記光を選択照射することにより、物質を固定化する領域をパターンニングすることを含む請求項11又は12記載の方法。

【請求項14】 請求項11ないし13のいずれか1項に記載の方法により前記物質が固定化された基体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ポリペプチド、核酸、脂質等の所望の物質を基体上に固定化するための物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基

体に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来より、抗体又は抗原をプレート上に固定化した、免疫測定のためのイムノプレートや、核酸をチップ上に固定化したDNAチップ等が広く用いられている。従来、基体上にタンパク質や核酸を固定化する方法の1つとして、物理吸着が広く用いられている。すなわち、例えばポリスチレンのような疎水性の基体と、基体上に固定化すべきタンパク質や核酸の水溶液とを接触させて放置することにより、物理吸着によってタンパク質や核酸が基体上に固定化される。

【0003】

しかしながら、物理吸着を用いる方法では、基体と固定化物質との結合が弱く、物質を固定化した基体の安定性が不十分であるという問題がある。また、目的のタンパク質や核酸で被覆されなかった領域への非特異吸着を防止するために、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、スキムミルク等のタンパク質（タンパク質を固定化する場合）や、サケ精子DNA等のDNA（DNAを固定化する場合）でブロッキングすることが行われているが、ブロッキングによる非特異吸着の防止効果も必ずしも満足できるものではない。

【0004】

また、基体上の官能基と、固定化すべきタンパク質や核酸の官能基とを共有結合させることにより基体上にタンパク質や核酸を固定化することも行われている。しかしながら、この方法では、用いる官能基が物質の活性部位の中又はその近傍にある場合には、固定化により物質の活性が失われてしまう。また、適当な官能基が存在しない場合には、この方法により固定化することができない。また、物理吸着の場合と同様、ブロッキングにより非特異吸着が防止されているが、その防止効果は必ずしも満足できるものではない。

【0005】

【特許文献1】 特開平11-337551号公報

【特許文献2】 特開2001-337089号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は、基体上に固定化すべき物質を共有結合により固定化することができ、かつ、非特異吸着の防止効果に優れた、物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

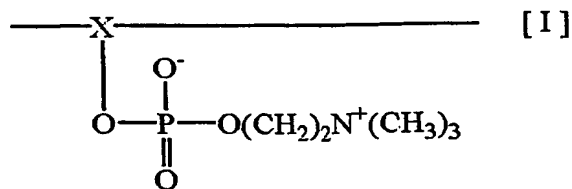
本願発明者らは、生体膜が種々の物質と接触するにもかかわらず、非特異吸着がほとんど起きないことに着目し、生体膜の構成成分であるホスホリルコリンを含む高分子を利用して、所望の物質を基体に固定化することにより非特異吸着を有効に防止できるのではないかと考えた。そして、光反応により共有結合を行う、アジド基のような光反応性基を利用して共有結合を行うことにより、物質を共有結合により固定化することを考えた。そして、一分子内に、ホスホリルコリン基と、光反応性基を複数含むポリマーを用いることにより、該ポリマーは、光反応性基を介して基体及び固定化すべき物質に結合し、これによって、固定化すべき物質は該ポリマーを介して基体上に共有結合され、さらに、ホスホリルコリン基により非特異吸着が有効に防止されることに想到し、かつ、これを実験的に確認して本発明を完成した。

【0008】

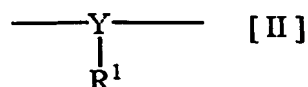
すなわち、本発明は、基体上に所望の物質を固定化するために用いられる水溶性のポリマーであって、下記一般式[I]で表される構造を有する単位と、下記一般式[II]で示される構造を有する単位を含む、物質固定化剤を提供する。

【0009】

【化5】



【化6】



(ただし、一般式[I]及び[II]中、X及びYは、互いに独立して、重合した状態の重合性原子団を表し、 R^1 は光反応性基を有する原子団を表し、一般式[I]及び[II]で表される単位は、それぞれ2個以上であり、かつ、一般式[I]で表される単位の数、一般式[II]で表される単位の数よりも大きい)。

【0010】

また、本発明は、基体に固定化すべき物質と、上記本発明の物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を前記基体に塗布し、光照射することを含む、基体上への物質の固定化方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明の方法により前記物質が固定化された基体を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

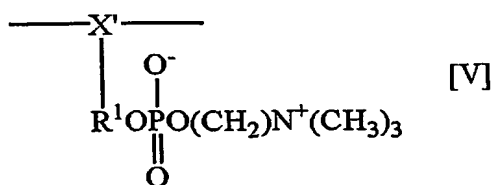
上記の通り、本発明の物質固定化剤は、上記一般式[I]で表される構造を有する単位(以下、便宜的に「単位[I]」と言うことがある)と、上記一般式[II]で示される構造を有する単位(以下、便宜的に「単位[II]」と言うことがある)を含む水溶性のポリマーである。

【0012】

単位[I]は、ホスホリルコリン基を含む単位であり、Xは重合した状態の重合性原子団を表す。Xとしては、ビニル系モノマー残基が好ましい。単位[I]としては、下記一般式[V]に示されるものが好ましい。

【0013】

【化7】



(ただし、式中、X'は、ビニル部分が付加重合している状態のメタクリルオキシ基、メタクリルアミド基、アクリルオキシ基、アクリルアミド基、スチリルオキシ基又はスチリルアミド基を表し、 R^1 は単結合又は炭素数1~10のアルキレン基(ただし1個又は2個のヒドロキシル基で置換されていてもよい)を表す)。

【0014】

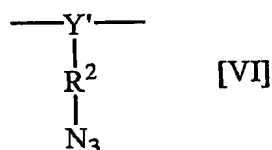
このような単位の好ましい具体例として、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、2-アクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、N-(2-メタクリルアミド)エチルホスホリルコリン、4-メタクリロイルオキシブチルホスホリルコリン、6-メタクリロイルオキシヘキシルホスホリルコリン、10-メタクリロイルオキシデシルシルホスホリルコリン、 ω -メタクリロイルジオキシエチレンホスホリルコリン又は4-スチリルオキシブチルホスホリルコリンに由来する(すなわち、これらの単位を重合させた)単位を挙げることができる。これらの中でも2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに由来する単位が特に好ましい。

【0015】

一方、単位[II]中の光反応性基の好ましい例としてアジド基($-N_3$)を挙げることができるがこれに限定されるものではない。また、一般式[II]のYとしては、ビニル系モノマー残基が好ましい。単位[II]の好ましい例として、下記一般式[V]で示されるものを挙げることができる。

【0016】

【化8】



(ただし、Y' は、ビニル部分が付加重合している状態のメタクリルオキシ基、メタクリルアミド基、アクリルオキシ基、アクリルアミド基、スチリルオキシ基又はスチリルアミド基を表し、 R^2 は単結合、炭素数1~10のアルキレン基(ただし1個又は2個のヒドロキシル基で置換されていてもよい)、フェニレン基(ただし、1~3個の炭素数1~4のアルキル基又はヒドロキシル基で置換されていてもよい。)

【0017】

単位[I]の数は単位[II]の数よりも大きく、その比率は、特に限定されないが、100:2~100:50程度が好ましく、特に100:5~100:20程

度が好ましい。このように、ポリマーは、ホスホリルコリン基を有する単位[I]から主として成ることにより、非特異吸着が効果的に防止される。また、水溶性ポリマーの分子量は、特に限定されないが、通常、1,000～1,000,000程度であり、好ましくは、5,000～100,000程度である。

【0018】

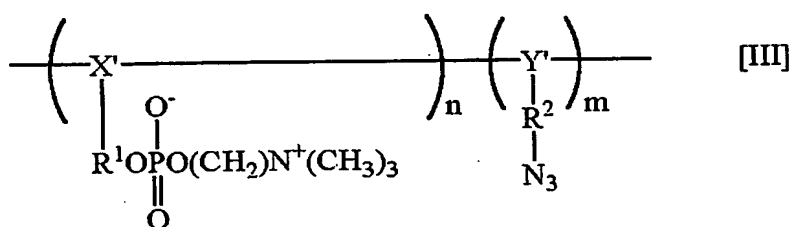
上記水溶性ポリマーは、単位[I]と単位[II]のみから成るものが好ましいが、本発明の効果に悪影響を与えない範囲で他の重合性モノマー由来の単位を含んでもよい。このような他の単位の割合は、本発明の効果に悪影響を与えない範囲であれば特に限定されないが、通常、通常、ポリマー中の全単位中の30モル%以下、好ましくは10モル%以下である。

【0019】

本発明の物質固定化剤の好ましい例として、下記一般式[III]で表すものを挙げるができる。

【0020】

【化9】



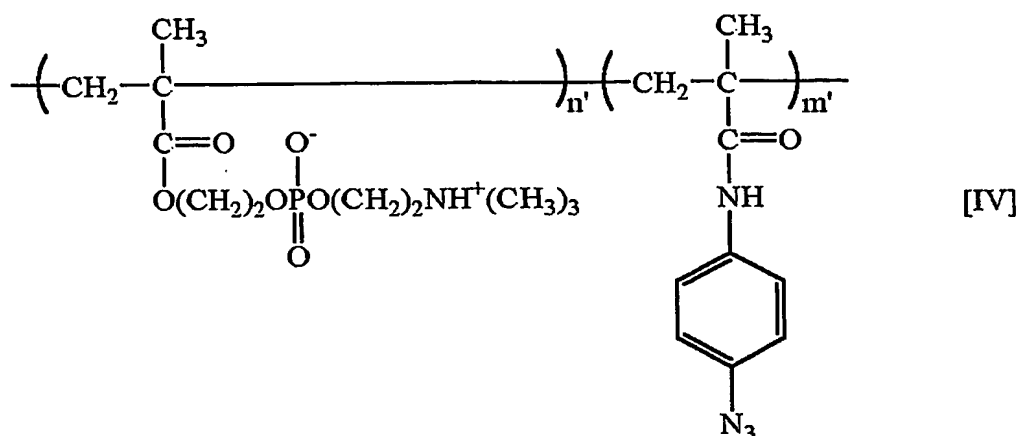
(ただし、式中、X'、Y'、R¹、R²は上記定義と同じ意味を表し、n及びmは、互いに独立して2以上の整数であり、かつ、nはmよりも大きく、X'を含む単位とY'を含む単位はランダムな順序で結合している。)

【0021】

上記一般式[III]で示される化合物の中でも、特に下記式[IV]で示されるポリマーが好ましい。

【0022】

【化 10】



(ただし、 n' は50ないし200の整数、 m' は5ないし40の整数を表し、ホスホリルコリン含有単位と、アジドフェニル基含有単位はランダムな順序で結合している)。

【0023】

本発明の物質固定化剤は、水溶性であり、水に対する溶解度（水100gに溶解するグラム数）は、好ましくは5以上である。

【0024】

本発明の物質固定化剤を用いて固定化される物質は、特に限定されないが、ポリペプチド（糖タンパク質及びリポタンパク質を包含する）、核酸、脂質並びに細胞（動物細胞、植物細胞、微生物細胞等）及びその構成要素（核、ミトコンドリア等の細胞内小器官、細胞膜や単位膜等の膜等を包含する）を例示することができる。本発明の物質固定化剤に光反応性基として用いられるアジド基は、光を照射することにより窒素分子が離脱すると共に窒素ラジカルが生じ、この窒素ラジカルは、アミノ基やカルボキシル基等の官能基のみならず、有機化合物を構成する炭素原子とも結合することが可能であるので、ほとんどの有機物を固定化することが可能である。

【0025】

基体としては、何ら限定されるものではなく、マイクロプレートのウェルや、DNAチップ等のチップ等を例示することができる。また、基体の材質も何ら限定されるものではなく、従来から広く用いられているポリスチレン等の有機化合

物から成る基体を用いることができる。

【0026】

本発明の物質固定化剤は、上記した単位[I]及び単位[II]を単に重合させることにより製造することができる。あるいは、側鎖（ホスホリルコリン基含有基及び光反応性基含有基）を含まない主鎖のポリマーを先に合成し、後から側鎖を結合してもよい。また、ホスホリルコリン基含有基を有する単位[I]と、光反応性基を有さない単位[II]とを先ず重合し、後から光反応性基含有基を結合させてもよい。下記の実施例ではこの方法を採用している。なお、モノマーの重合や、側鎖の結合は、当業者の技術常識に従って容易に実施することができるし、下記の実施例にもその一例が具体的に記載されている。

【0027】

本発明の物質固定化剤を用いて、基体上に所望の物質を固定化することは、次のようにして行うことができる。先ず、基体に固定化すべき物質と、本発明の物質固定化剤とを含む水溶液又は水懸濁液を前記基体に塗布する。この場合、水溶液中の物質固定化剤の濃度（重量基準）は、特に限定されないが、通常、0.005%～10%程度であり、好ましくは0.04～1%程度である。また、固定化すべき物質の濃度（重量基準）は、通常、用いる物質固定化剤の10倍ないし200倍程度であり、好ましくは20倍ないし100倍程度である。

【0028】

次に、塗布した液を好ましくは乾燥した後、光を照射する。光は、用いる光反応性基がラジカルを生じさせることができる光であり、光反応性基としてアジド基を用いる場合には、紫外線が好ましい。照射する光線の線量は、特に限定されないが、通常、1cm²当たり1mW～100mW程度である。

【0029】

光を照射することにより、ポリマー中の光反応性基がラジカルを生じ、ポリマーが基体及び固定化すべき物質の双方と共有結合する。その結果、固定化すべき物質がポリマーを介して基体に固定化される。なお、本発明の方法では、光反応性基により生じるラジカルを利用して結合反応を行うので、固定化すべき物質の特定の部位と結合するのではなく、ランダムな部位と結合する。従って、活性部

位が結合に供されて活性を喪失する分子も当然出てくると考えられるが、活性部位に影響を与えない部位で結合する分子も当然存在するので、本発明の方法によれば、従来、適当な置換基が活性部位又はその近傍にあるために、共有結合で固定化することが困難であった物質であっても、全体として活性を喪失させることなく、共有結合により基体に固定化することができる。

【0030】

光が照射されなかった部分では、光反応性基が基体及び物質に結合しないので、洗浄すればポリマーも物質も除去される。従って、フォトマスク等を介して選択露光を行うことにより、任意のパターンで物質を固定化することができる。従って、選択露光により、マイクロアレイ等の任意の種々の形状に物質を固定化することができるので、非常に有利である。

【0031】

本発明の方法は、抗体若しくはその抗原結合性断片又は抗原を固定化した免疫測定用プレートの作製、DNAやRNAを基板上に固定化した核酸チップ、マイクロアレイ等の作製に好適に用いることができるがこれらに限定されるものではなく、例えば、細胞全体やその構成要素の固定化等にも適用することができる。

【0032】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

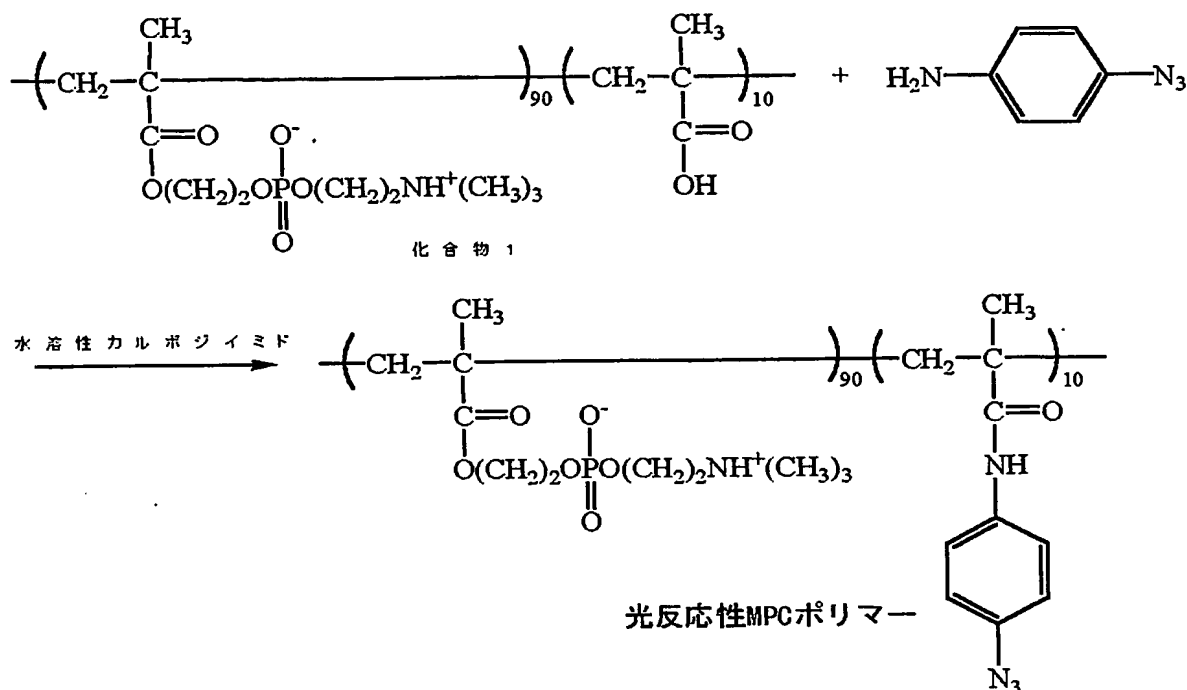
【0033】

実施例 1 物質固定化剤の製造

下記の合成スキームにより光反応性メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを合成した。

【0034】

【化11】



【0035】

2mLのPMAc水溶液(5wt%=50mg/mL)(PMAcは2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(90%)とメタクリル酸(10%)のランダム共重合体で上記反応式中の化合物1)に12.44mgの4-アジドアニリンと、17.47mgの水溶性カルボジイミド(WSC)を混合し、最終的に純水で100mLにメスアップした。pH7で24時間攪拌(冷蔵庫中4℃)し、反応終了後、透析カセット(PIERCE社製)で、外液からアジドアニリンのUV吸収がなくなるまで透析。最後に凍結乾燥し光反応性MPCポリマーを得た。

【0036】

試験例1 光反応性MPCポリマーの非特異吸着性

実施例1で製造した光反応性MPCポリマーの非特異吸着性を、以下のようにFITC化タンパク質又は細胞と接触させることにより調査した。

【0037】

(1) MPCポリマーの基板上への結合

実施例1で製造した光反応性MPCポリマーを、純水に10 mg/mlの濃度で溶解し、ポリスチレン基板(直径2cm)上に25μl塗布して風乾した。次に、幅10

0 μ m のストライプパターンを有するフォトマスクを介して紫外線（波長260 nm）を選択照射した（照射量16mW/cm²）。次いで、水洗し、ポリスチレン基板上に光反応性MPCポリマーをストライプ状に固定化した。

【0038】

(2) FITC（フルオレッセインイソチオシアネート）化タンパク質の吸着

FITC-BSA（シグマ社より市販）水溶液（濃度10 mg/ml）、FITC-IgG（シグマ社より市販）水溶液（濃度2 mg/ml）又はFITC-フィブリノーゲン水溶液（濃度 3.7 mg/370 μ l）を、上記パターンが形成された基板上に50 μ l 載せ、37℃で10分間反応させた。PBSで洗浄後、乾燥させ、蛍光顕微鏡で観察した。

【0039】

その結果、光反応性MPCポリマーが固定化されていない領域にのみ蛍光が見られ、極めて明瞭なストライプパターンが観察された。これにより、MPCポリマーがタンパク質を非特異吸着しないことが確認された。

【0040】

なお、上記試験に用いたFITC-フィブリノーゲンは、次のようにして調製した。すなわち、フィブリノーゲン20 mgにFITC-I 0.1 mgを加えて50 mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH 8.5）7 mlに溶解し、4℃で一夜反応させ、排除分子量3000のフィルターで遠心濃縮した。脱塩のため、MilliQ水（商品名）で3回遠心分離した。その後、凍結乾燥して3.7 mgのFITC-フィブリノーゲンを得た。

【0041】

(3) 細胞の吸着

実施例1で調製した光反応性MPCポリマーを、上記と同様にポリスチレン基板上にパターンをつけて固定化し、水洗後、70%エタノールを用いて滅菌し、滅菌水で洗浄した。得られた基板をそのまま、又は1% BSA/PBS溶液若しくは1%フィブリノーゲン/PBS溶液250 μ lを基板に載せて37℃で10分間反応させ、水洗後、細胞の吸着試験に供した。用いた細胞は、Cos 7細胞（理化学研究所細胞バンクより市販）及びRaw 246細胞（理化学研究所細胞バンク社より市販）であった。細胞を基板上に播き、1時間後及び4時間後に顕微鏡で観察した。

【0042】

その結果、光反応性MPCポリマーを固定化した領域には、細胞がほとんど吸着されず、細胞がストライプ状に吸着された。とりわけ、光反応性MPCポリマー単独の場合及び光反応性MPCポリマーにフィブリノーゲンを塗布した基板で明瞭なストライプパターンが観察された。

【0043】

実施例 2 免疫測定

以下に記載する方法により、本発明の方法により作製した、コラーゲン固定化基板を用いて、コラーゲンを検出する免疫測定を行った。

【0044】

方法

- (i) 0.1%光反応性MPCポリマー（実施例1で製造したもの）水溶液と0.5%コラーゲン水溶液を1:10で混合。
- (ii) 35mmポリスチレンディッシュに3 μ lのMPC/コラーゲン水溶液をスポット。
- (iii) 乾燥後、UV照射（波長260nm、照射量16mW/cm²、10秒間）により固定化。
- (iv) PBSで3回洗浄。
- (v) 一次抗体として抗コラーゲン抗体（モノサン社より市販）（5 μ g/ml）又は抗ヒトCD3抗体（ファーマンジェン社より市販）（5 μ g/ml）をスポット上に100 μ l添加、室温で4時間インキュベーション。
- (vi) PBSで3回洗浄後、FITC標識二次抗体（抗ラビットIgG あるいはマウスIgG抗体）（アマーシャム社より市販）（5000倍希釈）100 μ l添加、室温で1時間インキュベーション。
- (vii) PBSで3回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察。
- (viii) コントロールとしてMPCポリマーのみをスポットしたもの、またタカラ社製Hubbleスライドガラスにポリマー無しでコラーゲン溶液のみをスポットしたもので同様の操作を行った。さらに、コントロールとして、負電荷のみを有するアジドフェニル基導入ポリアクリル酸（PAAc）とコラーゲンの水溶液、又は正電荷のみを有するアジドフェニル基導入ポリアリルアミン（PAAm）とコラーゲンの水溶液を同様にポリスチレン基板上にスポットしたものをを用いて同様の操作

を行った。

【0045】

結果と考察

抗コラーゲン抗体による免疫染色後、蛍光顕微鏡によりMPCポリマー／コラーゲンスポットに蛍光が観察され、抗CD3抗体では染色されず、コラーゲンが特異的に染色されることが確認された。コントロールとして行ったMPCポリマーのみのスポットではほとんど蛍光は無く、負電荷のみを有するアジドフェニル基導入ポリアクリル酸（PAAc）とコラーゲンでも、蛍光はなかった。正電荷のみを有するアジドフェニル基導入ポリアリルアミン（PAAm）では、抗体の種類によらず非特異的な染色が起こった。以上のことから、MPCポリマーの非特異的吸着が少ない特性を実証することが出来た。コントロールとしてタカラ社製のHubbleスライドガラスへコラーゲンの固定化を行ったが、スポット上に蛍光は観察されず、この場合にはコラーゲンは固定化できなかったと考えられる。以上よりMPCポリマーを用いてタンパク質の共有固定化が可能となり、非特異的吸着を抑制し、有効であることが明らかになった。なお、結果を下記表1にまとめて示す。

【0046】

【表1】

表1

	抗コラーゲン抗体	抗CD3抗体
MPCポリマー／コラーゲン	蛍光有	無
MPCポリマー	無	無
PAAc／コラーゲン	無	無
PAAm／コラーゲン	有	有

【0047】

【発明の効果】

本発明により、基体上に固定化すべき物質を共有結合により固定化することができ、かつ、非特異吸着の防止効果に優れた、物質固定化剤、それを用いた物質

固定化方法及びそれを用いた物質固定化基体が提供された。本発明によれば、固定化すべき物質を、その種類に関係なく共有結合により固定化することができ、安定な固定化基板を得ることができる。また、本発明の物質固定化剤を用いて物質を固定化すると、非特異吸着が効果的に防止される。さらに、本発明の物質固定化剤を用いて物質を固定化する場合、選択露光を行うことにより、固定化物質のパターニングも可能であり、容易にマイクロアレイ等の任意のパターンに物質を固定化することができる。

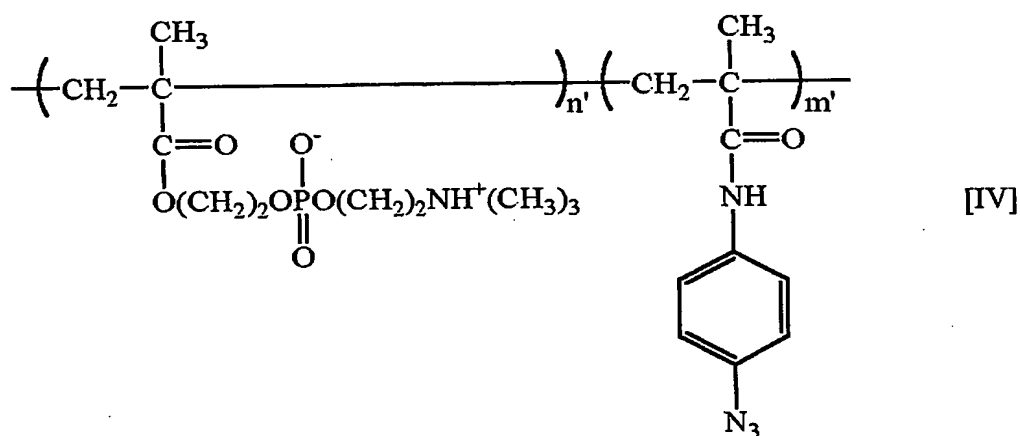
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基体上に固定化すべき物質を共有結合により固定化することができ、かつ、非特異吸着の防止効果に優れた、物質固定化剤、それを用いた物質固定化方法を提供すること。

【解決手段】 基体上に所望の物質を固定化するために用いられる水溶性のポリマーであって、例えば下記式[IV]で示されるような、アジド基とホスホリルコリン基を含むポリマーを提供した。

【化1】



【効果】 本発明によれば、固定化すべき物質を、その種類に関係なく共有結合により固定化することができ、安定な固定化基板を得ることができる。また、本発明の物質固定化剤を用いて物質を固定化すると、非特異吸着が効果的に防止される。さらに、本発明の物質固定化剤を用いて物質を固定化する場合、選択露光を行うことにより、固定化物質のパターニングも可能であり、容易にマイクロアレイ等の任意のパターンに物質を固定化することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-093834
受付番号	50300526834
書類名	特許願
担当官	小松 清 1905
作成日	平成15年 4月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月31日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-093834

出願人履歴情報

識別番号

[591243103]

1. 変更年月日

1993年 5月17日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号

氏 名

財団法人神奈川科学技術アカデミー

特願 2003-093834

出願人履歴情報

識別番号

[503120106]

1. 変更年月日

2003年 3月31日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都大田区千鳥2-28-2 レゾン千鳥町201

氏名

山内 哲也